VERGLEICHENDE DIAGNOSTIK VON HERPES-SIMPLEX-INFEKTIONEN MIT VIRUSNACHWEIS IN DER GEWEBEKULTUR UND MITTELS IMMUNOFLUORESZENZ

Ulrike Kopp

1979

Aus der Kinderklinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. K. Betke

VERGLEICHENDE DIAGNOSTIK VON HERPES-SIMPLEX-INFEKTIONEN MIT VIRUSNACHWEIS IN DER GEWEBE-KULTUR UND MITTELS IMMUNOFLUORESZENZ

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Ulrike Kopp
aus
Neubiberg
1979

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. P. Peller
Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. K. Betke
Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung: 5.7.1979

UNIV. LEIDEN BIBL.

Herrn Prof. Dr. med. O. Goetz und Herrn Priv. Doz. Dr. P. Peller möchte ich für die Überlassung des interessanten Themas und für die fachliche Beratung während meiner Arbeit besonders danken.

Außerdem danke ich Frau H. Nickel, Frau R. Stellmach und Frau H. Gramm herzlich, die mir während meiner Arbeit im Viruslabor technische Anleitung und Unterstützung gaben.

Inhaltsübersicht

	Seite
A) Einleitung	1
B) Eigene Untersuchungen	8
I. Methodik und Probanden	8
1. Methodik	8
a) Virusisolierung in Zellkulturen	8
b) Immunofluoreszenztest	10
2. Probanden	14
II. Ergebnisse	15
1. Nachweis von Herpesviren in Zellkulturen	15
a) Abstriche von Patienten mit Verdacht auf Herpes-simplex-Infektion	15
b) Abstriche von Patientinnen mit Fluor vaginalis	19
2. Nachweis von Herpesviren mit Hilfe der indirekten Immunofluoreszenz	20
3. Differenzierung von Herpes-simplex-Virus Typ 1 und Typ 2 mit Hilfe der indirekten Immunofluoreszenz	22
III. Diskussion der Ergebnisse	25
C) Zusammenfassung	30
D) Literatur	31

A) Einleitung

Das Herpes-simplex-Virus ist ein DNS-Virus mit einem Durchmesser von 90 - 130 nm und gehört, wie auch das Varizella-Zoster-, das Epstein-Barr- und das Zytomegalie-Virus, zur Herpesgruppe. (50)

Die Virusätiologie der Herpeskrankheit wurde erstmals 1912 von GRÜTER, anschließend 1919 von LOEWENSTEIN und 1920 von DOERR beschrieben (13). 1929 gelang es PARKER und NYE sowie GILDEMEISTER und Mitarbeitern, das Herpesvirus auf Gewebekulturen zu züchten (13). 1931 kultivierten WOODRUFF und GOODPASTURE Herpesviren in bebrüteten Hühnereiern (24), und 1932 glückte SADDINGTON die Übertragung des Virus auf Zellkulturen (13).

Inzwischen wurden zahlreiche Methoden für die Anzüchtung und Identifizierung des Herpesvirus (=HSV) entwickelt. Herpesviren vermehren sich in vielen Versuchstieren, vor allem Babymäusen, erwachsenen Mäusen und Kaninchen, und auf verschiedenen Zellkulturen, wie Kulturen von Affennieren, embryonalen menschlichen Nieren, Hundenieren, Kaninchennieren, menschlichem Amnion, embryonalen Hühnerfibroblasten, Hela-Zellen und Hep-2-Zellen. Frühestens nach 48 Stunden kann man in den beimpften Zellkulturen eine Abrundung, Riesenzellenbildung und später Ablösung der befallenen Zellen erkennen. Dieses Phänomen, das das Vorhandensein von Viren anzeigt, wird cytopathischer Effekt (=CPE) genannt. Bei Tierversuchen liegen ab dem dritten Tag nach der Infektion Ergebnisse vor .
Da sich auch andere Virusarten in den angegebenen Versuchstieren und auf den Zellkulturen züchten lassen,

muß sich die Identifizierung des Virus durch den Neutralisationstest oder die Immunofluoreszenzfärbung anschließen. (5, 24)

Seit KAUSCHE und Mitarbeiter 1936 das Tabakmosaikvirus im Elektronenmikroskop beobachteten (5), wurden verschiedene Verfahren entwickelt, Viren elektronenmikroskopisch darstellbar zu machen. Die Darstellung von Herpesviren gelingt z. B. mit der Methode des "Negative staining" gut (5,15,16,29). Herpes-simplex-Viren erscheinen im Elektronenmikroskop als runde Elementarkörperchen mit ringförmiger Innenstruktur und Hülle. Durch ihre Morphologie lassen sie sich zwar von anderen Virusarten, nicht aber von anderen Angehörigen der Herpesgruppe unterscheiden. So ist z. B. die Unterscheidung einer Herpes-simplex- von einer Varizella-Zoster-Infektion, die sich klinisch sehr ähneln können, nicht möglich, weil die beiden Viren nur in ihrer Größe verschieden sind (29).

Für die Identifizierung von Herpesviren sowie von Antikörpern gegen sie im Serum eignen sich Methoden wie Hämagglutination (3, 10, 41), KBR (29), Immundiffusion (41), Neutralisationstest und Mikroneutralisation (10), Immunelektrophorese (19, 45) und Immunofluoreszenz (4, 9, 12, 14, 20, 22, 25, 35, 36, 48).
Die genannten Methoden haben gegenüber Tierversuch und Zellkultur den Vorteil, daß sie wesentlich rascher durchführbar sind.

Auch für die Differenzierung der beiden Typen des Herpes-simplex-Virus, die sich in einigen Antigenen unterscheiden (6), sind die serologischen Verfahren geeignet. Nach SCHNEEWEIS und NAHMIAS (41) sowie JEANSOON (19)

haben die beiden Typen drei gemeinsame Antigene. Typ 1 hat außerdem zwei, Typ 2 ein spezifisches Antigen. Folgende Methoden werden für die Typendifferenzierung angewendet: Neutralisationstest oder Mikroneutralisation (10), Immundiffusion (41), Hämagglutinationshemmtest (3, 18, 41), Immunelektrophorese (19, 45, 46, 47), Ionenaustauschchromatographie (47), KBR (29) und Immunofluoreszenz (22, 25, 48).
Auch im Tierversuch verhalten sich die beiden Typen unterschiedlich: Typ 2 ist für weibliche Mäuse virulenter als Typ 1, außerdem verursacht Typ 1 auf der Chorionallantoismembran kleine, Typ 2 dagegen große, konfluierende Herde (10, 29).

Da wir bei unseren Versuchen mit der Immunofluoreszenzmethode arbeiteten, wollen wir an dieser Stelle näher auf deren Entwicklung und Anwendung eingehen.
1950 entwickelten COONS und KAPLAN (7) die Methode der direkten Immunofluoreszenz zum Nachweis von Antigenen oder Antikörpern. Dabei verbinden sich intrazellulär gelegene Viren mit Fluoreszein-markierten Antikörpern. Die Antigen-Antikörper-Komplexe werden so im Fluoreszenzmikroskop sichtbar. Bei der indirekten Immunofluoreszenz dagegen, die heute vor allem angewendet wird, werden zunächst Antigen und Antikörper zusammen inkubiert und bilden einen Komplex. Anschließend wird Fluoreszein-markiertes Antiglobulinserum hinzugefügt, welches sich an die Antigen-Antikörper-Komplexe anlagert und sie dadurch im Fluoreszenzmikroskop erkennbar werden läßt. Die indirekte Methode hat den Vorteil, daß das markierte Antiglobulinserum, auch Konjugat genannt, für verschiedene Antigene und Antikörper verwendet werden kann. Außerdem erscheint die Fluoreszenzfärbung bei der indirek-

ten Methode intensiver (5).
1956 färbten LEBRUN (21) und 1957 O'DEAN und DINEEN (31) als erste mit Herpes-simplex-Virus infizierte Zellen mit der Immunofluoreszenzmethode. 1959 wiesen BIEGELEISEN und Mitarbeiter (4) damit HSV-Antigene in Material von der Nasenschleimhaut und im Liquor nach. Der Nachweis von HSV-Antigenen auf infizierter Cornea mit Hilfe der Immunofluoreszenz gelang KAUFMANN 1960 (20), VOZZA und BALDUCCI 1961 (49), sowie PETTIT und Mitarbeitern 1964 (35). GRIST und Mitarbeiter beschrieben die Untersuchung von Gehirnbiopsien auf Herpesviren durch Immunofluoreszenz (48). GARDNER und Mitarbeiter färbten Material von HSV-infizierter Haut und Cornea (12), und LENIKKI verwendete die Fluoreszenzmethode 1971 zur Typendifferenzierung von Antikörpern gegen HSV im Serum (22). 1971 entwickelten NAHMIAS und Mitarbeiter (25) und 1974 VESTERGAARD und THYBO (48) ein Verfahren zur Schnelldiagnose und Typendifferenzierung bei HSV-Infektionen mit Hilfe der Immunofluoreszenz.
Alle genannten Autoren fanden eine nahezu vollständige Übereinstimmung der Ergebnisse bei der Fluoreszenzfärbung mit den Ergebnissen anderer Nachweismethoden für Herpesviren wie Zellkultur, Neutralisationstest und Züchtung auf der Chorionallantoismembran.

Die klinische Bedeutung der Herpesinfektionen und damit der Wert von einfachen und schnellen Nachweismethoden für das Virus ist außerordentlich groß.
Das Herpes-simplex-Virus zählt zu den häufigsten den Menschen befallenden Viren. Etwa 99 % aller Menschen machen eine Infektion durch, 70 bis 90 % bleiben Virusträger und behalten Antikörper im Serum (29,30). Das Virus kann bei 5% der Bevölkerung nachgewiesen werden (50).

Folgende unterschiedliche Krankheitsbilder können bei Herpes-simplex-Infektionen entstehen (29,30):
bei Primärinfektion 1. die Herpessepsis des Neugeborenen, 2. die Meningoencephalitis herpetica, 3. die Stomatitis aphthosa, 4. das Aphthoid von Pospischill und Feyrter, 5. die primäre herpetische Vulvovaginitis, 6. das Ekzema herpeticatum und 7. die Keratokonjunktivitis herpetica,
bei rezidivierender Infektion 1. der Herpes labialis rezidivans, 2. der Herpes genitalis rezidivans, 3. das Ekzema herpeticatum, 4. die rezidivierende Keratokonjunktivitis herpetica und 5. das Erythema exsudativum multiforme herpeticum.
Am häufigsten, aber relativ harmlos sind die Stomatitis aphthosa und die rezidivierenden Herpes-simplex- Infektionen der Haut und Schleimhäute. Einige Krankheiten, wie die Herpessepsis des Neugeborenen, können lebensbedrohlich werden.
Die beiden Typen des Herpes-simplex-Virus unterscheiden sich hinsichtlich der Lokalisation der Manifestationen am menschlichen Körper. Während Typ 1 meist im Gesicht vorkommt und die Gingivostomatitis, die Meningoencephalitis und das Ekzema herpeticatum verursacht, bevorzugt Typ 2 den Genitalbereich, den Rücken und die untere Extremität (10, 40).
In neuerer Zeit wird von zahlreichen Autoren ein Zusammenhang zwischen Infektionen mit dem Herpes-simplex-Virus Typ 2 im Genitalbereich und der Entstehung von Carcinomen der Cervix uteri vermutet.
1966 fanden NAIB und Mitarbeiter (28), daß bei Patientinnen mit Herpes genitalis signifikant häufiger, nämlich in 7%, histologisch ein Carcinoma-in-Situ der Cervix nachweisbar war als bei Patientinnen ohne Herpesinfektion, nämlich in 0,6%. Andere Autoren entdeckten,

daß der Antikörpertiter gegen das Herpes-simplex-Virus Typ 2 im Serum bei Patientinnen mit Cervix-Carcinomen gegenüber dem Antikörpertiter bei gesunden Kontrollpersonen signifikant erhöht ist. Die Titerangaben unterscheiden sich allerdings bei den einzelnen Autoren stark (1, 11, 26, 27, 33, 38, 39, 42, 43, 44).
Die erhöhten Antikörpertiter gegen HSV Typ 2 allein können jedoch für eine Virusgenese des Cervix-Carcinoms nicht als beweisend gelten (2, 11, 33). PETERSEN und Mitarbeiter (34), die vergeblich versuchten, das Genom des Herpesvirus in Zellen von Cervixcarcinomen zu finden, vermuteten, daß nur Genom-Spaltstücke in den Zellen vorhanden seien, und IBRAHIM und Mitarbeiter (17) konnten eine Verwandtschaft der Genome von Cervixcarcinomzellen und HSV Typ 2 nachweisen. PACSA und Mitarbeiter (32) fanden HSV Typ 2-Antigene in abgeschilferten Cervixzellen wesentlich häufiger bei Frauen mit Dysplasien und Carcinomen der Cervix als bei einer gesunden Kontrollgruppe. LI und RAPP (23) verimpften photodynamisch inaktiviertes mit Proflavin behandeltes HSV Typ 2 auf Hamster-Embryozellen und entdeckten, daß diese Zellen in neugeborenen Hamstern cancerogen wirkten. In einem Fall gelang es schließlich FREEDMAN und Mitarbeitern (11), das Herpesvirus aus dem Material eines Cervixcarcinoms zu isolieren.

Das Ziel unserer Arbeit war, eine schnell und einfach durchführbare Methode für die Diagnostik bei Herpes-simplex-Infektionen sowie für die Differenzierung der beiden Typen des Virus zu finden.
Zunächst prüften wir die Brauchbarkeit des indirekten Immunofluoreszenztestes für die Identifizierung von Virusstämmen, die wir durch Verimpfung von Abstrichmaterial auf Zellkulturen isoliert hatten.

Zusätzlich versuchten wir, mit Hilfe der indirekten Immunofluoreszenzmethode das Herpes-simplex-Virus direkt in Abstrichen von Herpeseffloreszenzen nachzuweisen.
Anschließend verwendeten wir die Immunofluoreszenzfärbung für die Zuordnung unserer Virusstämme zum Typ 1 bzw. 2 des Herpes-simplex-Virus.

B) Eigene Untersuchungen

I. Methodik und Probanden

1. Methodik

a) Virusisolierung in Zellkulturen

Wir legten Kulturen von humanen embryonalen Fibroblasten in Kulturröhrchen an. Die Röhrchen inkubierten wir vier Tage bei 37°C bis ein gleichmäßiger Zellrasen gewachsen war.

Medium:

Wir verwendeten Eagles Minimal Essential Medium der Firma Seromed mit 8,4% $NaHCO_3$, 100 E/ml Streptomycin und 100 E/ml Penicillin. Dem Medium wurde in der Wachstumsphase der Zellkultur 10% fetales Kälberserum, in der Erhaltungsphase 2% fetales Kälberserum zugesetzt.

Versuchsanordnung:

Zunächst entnahmen wir Material von Effloreszenzen, die nach dem klinischen Aspekt durch das Herpes-simplex-Virus verursacht waren. Frische Effloreszenzen ritzten wir mit einer sterilen Kanüle leicht an und entnahmen den Bläscheninhalt mit einem sterilen Wattetupfer. Bei älteren, bereits verkrusteten Läsionen lösten wir zunächst vorsichtig die Krusten und machten dann einen Abstrich vom Grund der Läsion. Als Abstrichtupfer verwendeten wir "Culturetten" der Firma Medical Supply Company, welchen eine Brechampulle mit Nährlösung beigege-

ben ist, die den Wattetupfer befeuchtet und den Abstrich dadurch konserviert.
Die Abstrichtupfer wuschen wir möglichst rasch in je 2 ml Erhaltungsmedium aus und versetzten dann 0,8 ml davon mit je 0,1 ml Moronal und 0,1 ml Refobacin.
Vaginalabstriche von Patientinnen mit Fluor genitalis mußten wegen der starken bakteriellen Verunreinigung vor der Verimpfung 30 Minuten bei 2000 Upm zentrifugiert werden. Nur den Überstand verwendeten wir für die Verimpfung, nachdem wir ihn wie oben mit Moronal und Refobacin versetzt hatten.
Je 0,2 ml der fertigen Lösung gaben wir in ein Fibroblasten-Kulturröhrchen, von welchem vorher das Medium abgegossen worden war. Nach halbstündiger Inkubation bei 37°C wurde jedes Röhrchen mit 2 ml Erhaltungsmedium gefüttert und anschließend wieder bei 37°C inkubiert.
Pro Patient beimpften wir zwei Fibroblastenröhrchen. Als Kontrolle dienten unbeimpfte Röhrchen, welchen nur 2 ml Erhaltungsmedium zugegeben worden war.
Wir kontrollierten die Kulturröhrchen täglich unter dem Mikroskop. War der Farbindikator des Mediums von rot nach gelb umgeschlagen, erneuerten wir es.
Frühestens 48 Stunden nach der Verimpfung konnten wir den Cytopathischen Effekt, den die Virusvermehrung anzeigt, beobachten. Zunächst bildeten sich im Zellrasen Plaques, d.h. einzelne begrenzte Stellen, an welchen sich die Zellen abrundeten und aus dem Zellverband lösten. Dabei entstanden auch mehrkernige Riesenzellen.

Die Plaques dehnten sich aus, und einen oder mehrere Tage später hatten sich alle Fibroblasten abgerundet und voneinander gelöst.
Wenn sich nach 14-tägiger Inkubation und Beobachtung kein CPE gezeigt hatte, werteten wir dies als negatives Ergebnis.
Die gewonnenen Virusstämme kultivierten wir in zwei bis drei Subpassagen weiter und froren sie dann bei -70°C ein. Nach dem Auftauen ließen sie sich in fast allen Fällen problemlos weiterzüchten.

b) Immunofluoreszenztest:

Wir verwendeten für unsere Versuche nur die indirekte Immunofluoreszenzmethode, deren Prinzip wir in der Einleitung bereits beschrieben haben.
Zunächst trugen wir mit HSV infizierte Zellen auf Objektträger auf, die mit Teflonspray in acht Felder unterteilt worden waren, je einen Tropfen der Zellsuspension pro Feld. Die Objektträger wurden luftgetrocknet und anschließend 10 Minuten in Aceton von 4°C fixiert.
Als Testseren verwendeten wir HSV 1 und HSV 2 Kaninchen IgG und als Konjugat Anti-Kaninchen-Serum IgG der Firma Dako. Die Testseren verdünnten wir mit Phosphatpuffer und gaben je einen Tropfen auf ein Objektträgerfeld. Nach halbstündiger Inkubation in der feuchten Kammer bei 37°C wuschen wir zweimal 10 Minuten in Phosphatpuffer, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Nun tropften wir auf jedes Objektträgerfeld Konjugat in der Verdünnung 1:20, inkubierten wieder 30 Minuten bei 37°C in der feuchten Kammer und wuschen erneut zweimal 10 Minuten. Dann trockneten wir die Ob-

jektträger auf Fließpapier und betteten die gefärbten Ausstriche mit einer Lösung von zwei Teilen Phosphatpuffer und einem Teil Glycerin unter einem Deckgläschen ein. Zur Auswertung verwendeten wir ein Fluoreszenzmikroskop der Firma Wild. Virushaltige Zellen leuchten hell grün auf, wobei vor allem die Zellwand, weniger deutlich das Zytoplasma, gefärbt erscheint.

Versuchsanordnung:

Wir färbten mit der Immunofluoreszenzmethode sowohl Zellmaterial von Abstrichen aus Effloreszenzen als auch Ausstriche von Zellkulturen, in welchen eine Virusvermehrung stattgefunden hatte.

Zum Virusnachweis in Abstrichen von Effloreszenzen unserer Probanden entnahmen wir möglichst viel Bläscheninhalt oder Krustenmaterial und bestrichen damit die Objektträgerfelder. Das Material reichte ungefähr für vier Felder. Die Zellen verrührten wir mit einem Tropfen Phosphatpuffer pro Feld.
Die Kulturröhrchen unserer mit Herpesvirus infizierten Zellkulturen zentrifugierten wir nach Ablösung aller Zellen, d. h. nach vollständiger Ausbildung des CPE, zehn Minuten bei 3000 Upm. Dann dekantierten wir den Überstand, schüttelten den Zellsatz auf und trugen mit einer Mikropipette je einen Tropfen davon auf ein Objektträgerfeld auf. Wenn die Objektträger getrocknet waren, färbten wir sie sofort oder nach Aufbewahrung bei $-20^{\circ}C$ in der oben beschriebenen Weise.
Die Antiseren verdünnten wir mit Phosphatpuffer, für die Färbung der Abstriche aus Effloreszenzen

im Verhältnis 1:20 und für die Färbung der Ausstriche von infizierten Zellkulturen in ansteigender Reihe beginnend mit 1:20 über 1:40, 1:80 usw. bis 1:2560 für das Antiserum HSV 1 und bis 1:1280 für das Antiserum HSV 2. Als Kontrolle diente ein Feld, welches mit Herpes-Antikörperfreiem Serum beschichtet wurde. Alle Kontrollen waren eindeutig als negativ zu beurteilen.
Um Unterschiede im Ergebnis durch Fehler bei der Färbung auszuschließen, führten wir die Austitrierung der Seren im Doppelversuch durch.
Nur die gefärbten Ausstriche, bei welchen Zellen mit heller Fluoreszenz der Zellwand zu erkennen waren, bezeichneten wir als positiv. Zeigte sich nur eine schwache grünliche Färbung des Zytoplasmas, werteten wir dies als negatives Ergebnis, auch wenn sich die Intensität der Fluoreszenz noch deutlich von der der Kontrolle unterschied. (siehe Abb. 1)

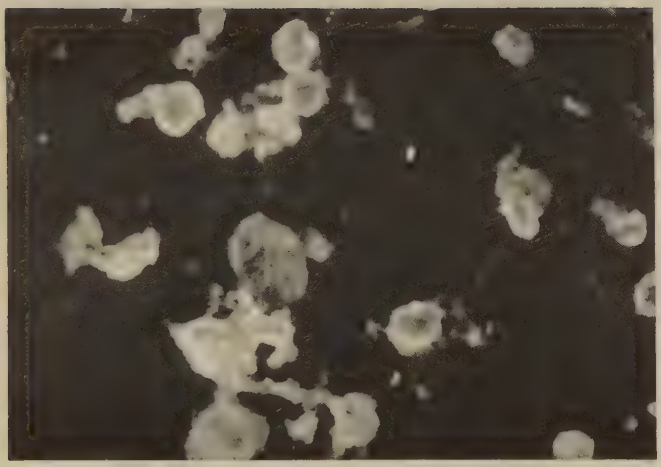

Abb.: 11 Indirekte Immunofluoreszenzfärbung von HSV-1 infizierten Zellen

2. Probanden

a) Personen mit Verdacht auf Herpes-simplex-Infektionen

Insgesamt fertigten wir von 35 Patienten, die aus der Ambulanz der dermatologischen Universitätsklinik München und der Universitätskinderklinik München stammten, Abstriche von Effloreszenzen an, die nach dem klinischen Aspekt durch das Herpes-simplex-Virus verursacht sein konnten.
Unter den Patienten waren 5 Kinder im Alter von 6 Monaten bis zu 9 Jahren und 30 Erwachsene im Alter von 20 bis 59 Jahren. 15 Patienten waren männlich, 20 weiblich.
Die klinische Vermutungsdiagnose lautete:

18 mal Herpes labialis
7 mal Herpes simplex facialis (Nase, Wange, Stirn)
5 mal Stomatitis aphthosa
1 mal Ekzema herpeticatum
1 mal Herpes-simplex-Effloreszenz am Rücken
3 mal Herpes genitalis

b) Patientinnen mit Fluor vaginalis

Bei 104 Patientinnen aus der Ambulanz der II. Frauenklinik der Universität München im Alter von 20 bis 62 Jahren, die unter Fluor vaginalis litten, aber klinisch keine Herpes-simplex-Infektion des Genitales zeigten, fertigten wir Abstriche von der Portio uteri an und untersuchten sie durch Verimpfung auf Zellkulturen auf das Vorkommen von Herpesviren.

II. Ergebnisse

1. Nachweis von Herpesviren in Zellkulturen

a) Abstriche von Patienten mit Verdacht auf Herpes-simplex-Infektion

Von den insgesamt 35 Abstrichen, die auf Zellkulturen verimpft worden waren, zeigten 17 nach einigen Tagen einen CPE. Durch die Immunefluoreszenzfärbung konnten wir später nachweisen, daß es sich bei diesen Fällen tatsächlich um Herpesviren gehandelt hatte.
Bei neun von den 18 Zellkulturen, die keine Virusvermehrung zeigten, ergab der weitere klinische Verlauf, daß es sich bei diesen Patienten mit großer Wahrscheinlichkeit nicht um HSV-Infektionen gehandelt hatte. Bei den fünf Fällen mit Verdacht auf Stomatitis aphthosa waren nur einzelne, untypische Aphthen der Mundschleimhaut zu sehen, die wohl bakterieller Genese gewesen sein dürften. In einem Fall wurde später ein Carcinom der Lippe festgestellt, in einem anderen handelte es sich nach genauer anamnestischer Befragung um eine Verletzung. Bei zwei Fällen, die sehr kleine Bläschen im Bereich des ganzen Gesichtes gezeigt hatten, lagen wahrscheinlich nicht-infektiöse allergische Dermatitiden vor. Bei den übrigen neun Fällen mußte die Diagnose Herpes-simplex-Infektion beibehalten werden, aber die Bläschen waren bei der Materialentnahme durchwegs bereits verkrustet und mehr als vier Tage alt. Wir nehmen an, daß aus diesem Grund kein oder nicht genügend vermehrungsfähiges Virus gewonnen werden konnte.

Bei drei Patienten mit rezidivierendem Herpes labialis, deren Abstriche zunächst in der Zellkultur negativ gewesen waren, gelang es beim nächsten Ausbruch der Krankheit Abstriche zu gewinnen , die in der Kultur Viruswachstum zeigten.
Bei den 17 Fibroblasten-Kulturen, in welchen ein CPE nachweisbar war, versuchten wir, eine Beziehung zwischen der Dauer bis zum Auftreten des CPE und dem Alter und Zustand der Effloreszenzen zum Zeitpunkt der Materialentnahme herzustellen. Dabei konnten wir folgende Ergebnisse erzielen : Waren die Bläschen beim Abstrich noch frisch, d.h. nicht oder kaum verkrustet, und konnte viel Material entnommen werden, vergingen bis zum Auftreten der ersten Anzeichen des CPE zwei bis drei, im Durchschnitt 2,3 Tage. Das Alter der Bläschen betrug dann meistens ein bis zwei Tage. Bei einem Fall von Ekzema herpeticatum waren die Effloreszenzen nach zwei Wochen noch frisch. Eine Ausnahme machte ein nur einen Tag altes, allerdings sehr winziges einzelnes Bläschen, bei dessen Abstrich bis zum Auftreten des CPE sieben Tage vergingen.
Waren die Bläschen beim Abstrich bereits angetrocknet oder verkrustet, war der CPE nach zwei bis sechs, im Durchschnitt nach 4.3 Tagen zu erkennen. Das Alter dieser Bläschen schwankte im allgemeinen zwischen fünf und sieben Tagen, einmal betrug es nur zwei Tage, in einem Fall handelte es sich um eine seit Wochen bestehende chronische Herpesefflores-zenz.
Bei vier Fällen waren Alter und Zustand der Effloreszenzen zum Zeitpunkt der Materialentnahme unbekannt. Die Dauer bis zum Auftreten des CPE betrug bei diesen Fällen zwei bis vier Tage.

Unsere Untersuchung hat ergeben, daß eine Beziehung zwischen dem Alter und Zustand der Herpeseffloreszenzen und der Dauer bis zum Auftreten des CPE in der beimpften Zellkultur hergestellt werden kann. Offensichtlich nimmt die Viruskonzentration mit zunehmendem Alter der Bläschen bis zum zweiten Tag noch zu, danach ab.

Insgesamt vergingen bis zu den ersten Anzeichen des CPE in Form von Zellabrundung und Ablösung aus dem Zellverband mindestens 48 Stunden, bis zur Ablösung aller Zellen einer Kultur mindestens vier Tage. Bei geringer Viruskonzentration war der CPE spätestens nach sieben Tagen nachweisbar. (siehe Tabelle 1)

Tabelle 1

Probanden Nr.	Alter der Effloreszenz in Tagen	Dauer bis. Auftreten d. CPE in Tagen	Zustand der Effloreszenz
1	1	3	frisch
2	1	3	frisch
3	1	7	frisch
4	2	2	frisch
5	2	2	frisch
6	2	2	frisch
7	14	2	frisch
8	2	5	eingetr.
9	4	4	eingetr.
10	5	2	eingetr.
11	7	6	eingetr.
12	7	6	eingetr.
13	chronisch	3	eingetr.
14	unbekannt	2	unbekannt
15	unbekannt	3	unbekannt
16	unbekannt	4	unbekannt
17	unbekannt	4	unbekannt

Tabelle 1: Beziehung zwischen dem Zustand und Alter der Herpeseffloreszenzen und der Dauer bis zum Auftreten des CPE in der Zellkultur

b) Abstriche von Patientinnen mit Fluor vaginalis

Alle Abstriche von 104 Patientinnen mit Fluor vaginalis, die auf Fibroblasten-Kulturen verimpft worden waren, zeigten auch nach zweiwöchiger Inkubation keinen CPE und boten damit keinen Anhalt für das Vorhandensein von vermehrungsfähigen Viren.

2. Nachweis von Herpesviren mit Hilfe der indirekten Immunofluoreszenz

Voraussetzung für die Anwendung der Immunofluoreszenzfärbung für den Nachweis von Viren in Abstrichen von Herpeseffloreszenzen ist, daß genügend zellhaltiges Material gewonnen werden kann. Uns gelang es bei 11 unserer 35 Patienten, parallel zur Verimpfung auf Zellkulturen, Material für die Fluoreszenzfärbung zu isolieren.
Bei sechs von diesen 11 Abstrichen erkannte man nach der Färbung hell grün fluoreszierende Zellen. Bei diesen sechs Fällen zeigten auch die gleichzeitig angelegten Zellkulturen Virusvermehrung.
Bei fünf Abstrichen waren zwar auf dem Objektträger Zellen zu sehen, sie unterschieden sich aber in ihrer Färbung nicht von der negativen Kontrolle. Die entsprechenden Zellkulturen blieben auch negativ.

Unser Versuch zeigt trotz der geringen Anzahl der Fälle, daß ein spezifischer Nachweis von Herpesviren im Bläschenmaterial mit Hilfe der indirekten Immunofluoreszenz möglich ist. Unsere Ergebnisse von der Verimpfung auf Zellkulturen und der Fluoreszenzfärbung stimmten völlig überein. (siehe Tabelle 2)

Tabelle 2

Zellkultur	Immunofluoreszenz	Anzahl der Fälle
positiv	positiv	6
negativ	negativ	5

Tabelle 2: Vergleich der Ergebnisse von Zellkulturen und indirekter Immunofluoreszenzfärbung

3. Differenzierung von Herpes-simplex-Virus Typ 1 und Typ 2 mit Hilfe der indirekten Immunofluoreszenz

Insgesamt konnten wir infizierte Zellen von 15 der 17 Virusstämme, die wir in Zellkulturen gezüchtet hatten, mit der Immunofluoreszenzmethode färben. Bei zwei Stämmen gelang es nicht, das Virus nach einer Lagerung bei $-70^{\circ}C$ wieder in neuen Subpassagen zu vermehren. Bei einem dieser beiden Fälle hatten wir jedoch durch die Immunofluoreszenzfärbung von Abstrichmaterial nachweisen können, daß es sich tatsächlich um eine Herpes-simplex-Infektion gehandelt hatte. Die 15 isolierten Virusstämme konnten alle mit Hilfe der Immunofluoreszenz als Herpes-simplex-Viren identifiziert werden.

Bei 12 Virusstämmen ermittelten wir höhere Titer bei der Färbung mit Antiserum gegen HSV 1 als mit Antiserum gegen HSV 2. Diese Stämme ordneten wir dem Typ 1 des Herpes-simplex-Virus zu. Dabei schwankten die Titer mit Antiserum 1 zwischen 1:320 und 1:1280, mit Antiserum 2 zwischen 1:160 und 1:320. Bei drei Stämmen unterschieden sich die Titer mit Antiserum 1 bzw. 2 um zwei Stufen, bei einem Stamm um drei Stufen, bei den restlichen acht nur um eine Stufe. (siehe Tabelle 3)

Drei Stämme identifizierten wir als Herpes-simplex-Virus Typ 2. Dabei war der Titer mit Antiserum 2 höher, nämlich 1:640, als mit Antiserum 1, nämlich 1:320.

Im Durchschnitt lagen die Titer bei der Immunofluoreszenzfärbung beim Herpesvirus Typ 1 mit dem Antiserum 1 bei 1:640 und mit dem Antiserum 2 bei 1:160, beim Herpesvirus Typ 2 dagegen mit Antiserum 1 bei 1:320, mit Antiserum 2 bei 1:640. Insgesamt ermittelten wir beim Virus Typ 1 höhere Titerstufen als bei Typ 2, was möglicherweise mit der höheren Anzahl der Anigene von Typ 1 (19, 41) zusammenhängt.

Die Unterschiede in der Höhe der gefundenen Titerstufen mit den verschiedenen Antiseren und Konjugaten der Firma Dako lagen im Rahmen der üblichen Schwankungsbreite.

Die mittels der indirekten Immunofluoreszenzfärbung identifizierten Typen 1 und 2 des Herpes-simplex-Virus korrelierten in folgender Weise mit der Lokalisation der Effloreszenzen:

Alle acht Fälle von Herpes labialis, drei Fälle von Herpes des Gesichtes an anderen Stellen, nämlich Stirn, Nase und Wange, sowie ein Ekzema herpeticatum waren Infektionen mit Typ 1. Als Typ 2 konnten wir einen Herpes genitalis, eine Herpeseffloreszenz am Rücken und einen Fall von Herpes simplex an der Wange eines Kindes klassifizieren. (siehe Tabelle 3)

Tabelle 3

Lokalisation der Effloreszenz	Titerhöhe Antiserum geg. Typ 1	Titerhöhe Antiserum geg. Typ 2
Lippe	1:320	1:160
Lippe	1:320	1:160
Wange	1:320	1:160
Ekz.herpetik.	1:320	1:160
Lippe	1:640	1:160
Lippe	1:640	1:160
Nase	1:640	1:160
Lippe	1:640	1:320
Lippe	1:640	1:320
Lippe	1:640	1:320
Stirn	1:640	1:320
Lippe	1:1280	1:160
Wange	1:320	1:640
Genitale	1:320	1:640
Rücken	1:320	1:640

Tabelle 3: Die mit Hilfe der indirekten Immunofluoreszenz ermittelten Titerstufen des Typ 1 und Typ 2 des Herpes-simplex-Virus und die Beziehung der beiden Typen zur Lokalisation der Effloreszenzen

III. Diskussion der Ergebnisse

In dieser Arbeit haben wir zunächst zwei Methoden, das Herpes-simplex-Virus aus Abstrichen zu isolieren und nachzuweisen, nämlich die Viruszüchtung in Zellkulturen und die indirekte Immunofluoreszenzfärbung, verglichen.

Bei der Kultivierung des Herpesvirus stellten wir übereinstimmend mit den anderen Autoren fest (24), daß der Nachweis von Virusvermehrung in Form des CPE frühestens 48 Stunden nach der Beimpfung der Kulturen möglich ist. Die Dauer ist abhängig vom Alter der Effloreszenzen zum Zeitpunkt der Materialentnahme und damit nach DANIELS und Mitarbeitern (8) von der Viruskonzentration. Sie kann sich bei geringer Viruskonzentration bis auf sieben Tage verlängern. Waren die Herpesbläschen älter als vier Tage und schon stark eingetrocknet, konnten wir in neun Fällen gar kein vermehrungsfähiges Virus mehr nachweisen.
Der Virusnachweis durch Verimpfung auf Zellkulturen hat außer der langen Dauer bis zum Vorliegen des Ergebnisses den Nachteil, daß sich die Virusidentifizierung anschließen muß. Eine Verwechslung mit anderen Viren, die auf den gleichen Zellen einen CPE verursachen können, ist möglich.(24, 47).

Die indirekte Immunofluoreszenzfärbung von Abstrichmaterial bietet wesentliche Vorteile: Erstens ist sie, ebenso wie die anderen serologischen Verfahren wie z. B. Hämagglutinationshemmung, Immunelektrophorese, Immundiffusion und Neutralisationstest für das gesuchte Virus spezifisch. Zweitens beansprucht sie nur ca. drei Stunden Zeit. Außerdem ist sie ohne großen technischen Aufwand, wie er vergleichsweise bei der Elektro-

nenmikroskopie notwendig ist, durchführbar.
Bei unserer Untersuchung stimmten die Ergebnisse von Fluoreszenzfärbung von Abstrichmaterial und parallel beimpften Zellkulturen in allen Fällen überein. Wegen der geringen Anzahl der untersuchten Fälle können wir daraus bisher noch keine endgültigen Schlüsse für die Brauchbarkeit der Fluoreszenzmethode ziehen.
Auch andere Autoren, nämlich PETTIT und Mitarbeiter (35) sowie KAUFMANN (20), die Material von der Cornea bei Keratitis dendritica färbten, und BIEGELEISEN und Mitarbeiter (4), GARDNER und Mitarbeiter (12) sowie VESTERGAARD und THYBO (48), die Abstrichmaterial von Bläschen und Liquor färbten, verglichen die Methode der Immunofluoreszenz mit der Viruszüchtung in Zellkulturen und fanden ebenso wie wir eine nahezu vollständige Übereinstimmung der Ergebnisse.
Die Immunofluoreszenz läßt sich auch zum Nachweis anderer Virusarten anwenden. Die Entdecker der Methode, COONS und KAPLAN (7) wiesen Rickettsien, Pneumokokken und Mumpsviren nach. VESTERGAARD und THYBO (48) färbten Abstriche von Zoster-Effloreszenzen, GOETZ und PELLER (14) wiesen in Rachenabstrichen Influenza-, Parainfluenza- und Masernviren nach.
Die Schwierigkeit der Fluoreszenzmethode liegt darin, daß genügend zellhaltiges Material gewonnen werden muß. Das ist oftmals nur im Anfangsstadium der Infektion möglich. VESTERGAARD und THYBO (48) und GARDNER und Mitarbeiter (12) entnahmen nicht nur Bläscheninhalt, sondern auch Material vom Bläschenboden mit einem Skalpell. Vielleicht lassen sich auf diese Weise auch bei älteren, verkrusteten Effloreszenzen noch genügend virushaltige Zellen gewinnen, aber dieses Verfahren ist für den Patienten natürlich belastender und wurde deshalb von uns nicht angewendet.

In weiterführenden Untersuchungen könnte man anhand einer größeren Anzahl von Patienten prüfen, bis zu welchem Tag nach Beginn der Herpeserkrankung Viren mit Hilfe der Immunofluoreszenz nachweisbar sind.

Ebenso rasch wie mit der Fluoreszenzfärbung lassen sich Herpesviren in Abstrichen elektronenmikroskopisch nachweisen. Hierbei ist aber eine Verwechslung mit dem Varizella-Zoster-Virus möglich, das dem Herpesvirus morphologisch gleicht, nur einen größeren Durchmesser hat als dieses. Außerdem ist die Elektronenmikroskopie technisch viel aufwendiger und teurer als die Immunofluoreszenz, die in jedem virologischen Labor ohne Schwierigkeit durchgeführt werden kann (5,15,16,29).

Im zweiten Teil dieser Arbeit versuchten wir, die Typen 1 und 2 des Herpes-simplex-Virus mit Hilfe der indirekten Immunofluoreszenz zu differenzieren. Dabei fanden wir Titerunterschiede von ein bis zwei Stufen bei der Färbung mit Antiserum gegen HSV 1 bzw. HSV 2, wobei beim Virus Typ 1 erwartungsgemäß der Titer gegen Antiserum 1 höher war, im Durchschnitt 1:640, als gegen Antiserum 2, im Durchschnitt 1:160. Entsprechend fanden wir bei den beiden Virusstämmen, die wir Typ 2 zuordneten, höhere Titer gegen Antiserum 2, nämlich 1:640, als gegen Antiserum 1, nämlich 1:320. Die Firma Dako, von der wir Immunseren und Konjugat bezogen, gibt vor allem für das Virus Typ 1 höhere Titer an, und zwar 1:2048 mit Antiserum 1 und 1:256 mit Antiserum 2. Die Titer für das Virus Typ 2 entsprechen mit 1:256 gegen Antiserum 1 und 1:512 gegen Antiserum 2 ziemlich genau unseren Ergebnissen.

Übereinstimmend mit NAHMIAS und Mitarbeitern (25) sowie VESTERGAARD und THYBO (48) stellten wir fest, daß eine Differenzierung der beiden Typen des Herpesvirus mit Hilfe der indirekten Immunofluoreszenzmethode möglich ist. Allerdings unterschieden sich bei unseren Untersuchungen die Titer im Einzelfall zu wenig, um die Virusstämme eindeutig als Typ 1 oder Typ 2 zu klassifizieren.

Bei der Zuordnung der Typen des Herpex-simplex-Virus zur Lokalisation der Effloreszenzen am menschlichen Körper fanden wir, ebenso wie andere Autoren (30,40), daß Typ 1 vor allem im Gesicht, Typ 2 dagegen im Bereich des Rückens, der unteren Extremität und des Genitales vorkommt.

Die genauere Bestimmung der Titerunterschiede zwischen Herpesvirus Typ 1 und 2 muß weiteren Untersuchungen mit einem größeren Patientenkollektiv überlassen bleiben. Wegen ihrer raschen und einfachen Durchführbarkeit ist die indirekte Immunofluoreszenz sicher eine brauchbare Methode.

Zusätzlich zu den Abstrichen von Patienten mit Verdacht auf Herpes-simplex-Infektionen untersuchten wir Abstriche von Patientinnen mit Fluor vaginalis auf das Vorhandensein von Herpesviren. In den über hundert Proben, die wir auf Zellkulturen verimpften, konnten wir jedoch in keinem einzigen Fall vermehrungsfähiges Virus nachweisen. Dadurch kann zumindest eine frische Herpes-simplex-Infektion des Genitales ausgeschlossen werden.
Allerdings beweist dieses negative Ergebnis nicht, daß keine Herpes-Antigene in den abgeschilferten Zellen vorhanden waren. Andere Autoren wie IBRAHIM und Mitarbeiter (17) konnten zwar kein vermehrungsfähiges Virus, wohl

aber HSV 2-Antigene in Cervixzellen nachweisen. PACSA und Mitarbeiter (32) fanden mit Hilfe der Immunofluoreszenzmethode HSV 2-Antigene in den Cervixzellen, und zwar bei 94% der Patientinnen mit invasivem Cervix-Carcinom, aber nur bei 9% der gesunden Kontrollpersonen.

Anknüpfend an diese Untersuchungen könnte man auch bei Frauen mit Fluor vaginalis mit Hilfe der indirekten Immunofluoreszenz prüfen, ob sich in Abstrichen von der Cervix HSV-Antigene nachweisen lassen, und ob sie häufiger vorkommen als bei gesunden Frauen.

C) Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst Abstriche von Probanden mit Verdacht auf Herpes-simplex-Infektionen verschiedener Lokalisationen gemacht und versucht, im Abstrichmaterial enthaltene Herpesviren in Zellkulturen zu züchten. Dabei zeigte sich, daß Herpesviren in Zellkulturen frühestens nach 48 Stunden, abhängig vom Alter der Effloreszenzen manchmal auch erst nach mehreren Tagen, nachweisbar sind.
Mit Hilfe der indirekten Immunofluoreszenzfärbung war es uns dagegen bereits nach drei Stunden möglich zu bestimmen, ob Viren im Abstrichmaterial vorhanden waren.
Im zweiten Teil dieser Arbeit versuchten wir, die Virusstämme, die wir duch Züchtung in Zellkulturen gewonnen hatten, mit Hilfe der Immunofluoreszenzmethode zu differenzieren. Dabei gelang es uns zwar, unsere Virusstämme im Einzelfall dem Typ 1 oder 2 des Virus zuzuordnen. Da die Titer bei der Färbung mit Antiserum gegen Typ 1 bzw. 2 aber nur um ein bis zwei Stufen differierten, war eine eindeutige Unterscheidung nicht möglich.
Bei unserer Untersuchung von Patientinnen mit Fluor genitalis gelang es uns in keinem einzigen Fall, aus Abstrichen von der Portio uteri vermehrungsfähige Herpesviren zu isolieren.

D) Literatur

1. Adam E., Kaufmann R.H., Melnick J.L., Levy A.H. and Rawls W.E.

Seroepidemiologic Studies of Herpesvirus Type 2 and Carcinoma of the Cervix III, Houston Texas.

Americ. J. Epidemiol. 96: 427 (1973)

2. Aurelian L.

Virions and Antigens of Herpesvirus Type 2 in Cervical Carcinoma.

Cancer Res. 33: 1539 (1973)

3. Bernstein M.T., Stewart J.A.

Method for Typing Antisera to Herpesvirus Hominis by Indirekt Hemagglutination Inhibition.

Appl. Microbiol. 4: 680 (1971)

4. Biegeleisen J.Z. jr., Scott L.V., Lewis V. jr.

Rapid Diagnosis of Herpes Simplex Virus Infections with Fluorescent Antibody.

Science 129; 640 (1959)

5. Bonin O.

Quantitative virologische Arbeitsmethoden

Georg Thieme Verlag Stuttgart : 166, 169, 265 (1973)

6. Brandis H.

Untersuchungen zur antigenen Analyse und Typendifferenzierung beim Herpesvirus hominis.

Fortschr. d. Med. 12: 463 (1963)

7. Coons A.H., Kaplan M.H.

Localization of Antigen in Tissue Cells. II.: Improvements in a Method for the Detection of Antigen by Means of Fluorescent Antibody.

J. Exptl. Med. 91: 1 (1950)

8. Daniels L.A., Le Goff S.G., Notkins A.L.

Shedding of Infectious Virus / Antibody Complexes from Vesicular Lesion of Patients with Recurrent Herpes Labialis.

The Lancet II,1: 524 (1975)

9. Doerr H.W., Gross G., Schmitz H.

Serologische Diagnostik bei Patienten mit HSV-Infektionen

In: Sonderforschungsbereich Med. Virol., Uni. Freiburg: 23 (1973 - 75)

10. Dowdle W.R., Nahmias A.J., Hartwell R.W. and Pauls F.P.

Association of Antigenic Type of Herpesvirus Hominis with Site of Viral Recovery.

J. Immunol. 99: 974 (1967)

11.Freedman R.S., Jossting A.L.L., Ryan J.T., Nkoni S.

A Study of Associated Factors, Including Genital Herpes, in Black Women with Cervical Carcinoma in Johannesburg.

S. Afr. Med. J., 48: 1747 (1974)

12.Gardner P.S., Mc Quillin J., Black M.M. and Richardson J.

Rapid Diagnosis of Herpesvirus Hominis Infections Superficial Lesions by Immunofluorescent Antibody Techniques.

Br. Med. J. 4: 89 (1968)

13.Gildemeister E., Haagen E., Waldmann O.

Handbuch der Viruskrankheiten I
Gustav Fischer Verlag Jena: 362 (1939)

14.Goetz O., Peller P.

Die Diagnostik von Virusinfektionen mit Hilfe der Immunofluoreszenz.

Monatsschrift f. Kinderheilk. 118: 392 (1970)

15.Grist N.R., Ross C.A. and Bell E.J.

Diagnostic Methods in Clinical Virology.

Blackwell Scientific Public: 23, 27 (1974)

16.Habel K. and Salzmann N.P.

Fundamental Techniques in Virology

Academic Press
New York and London: 505 (1969)

17. Ibrahim A.N., Ray M,, Megaw J., Brown R. and Nahmias A.J.

Common Antigens of Herpes Simplex Virus 2 Associated Hamster Tumors and Human Cervical Cancer.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 152: 343 (1976)

18. Ito M. and Barron A.L.

Typing of Isolates of Herpes Simplex Virus by Mixed Agglutination.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 146: 41 (1974)

19. Jeansoon Sti

Differentiation between Herpes Simplex Virus Type 1 and Type 2 Strains by Immuno-electroosmophoresis.

Appl. Microbiol. 7: 96 (1972)

20. Kaufmann H.E.

The Diagnosis of Corneal Herpes Simplex by Fluorescent Antibody Staining

Arc. Ophthalm. 64: 382 (1960)

21. Lebrun J.

Cellular Localization of Herpes Simplex Virus by Means of Fluorescent Antibody.

Virology 2: 496 (1956)

22. Lenikki P.

Immunofluorescent Assay of Herpesvirus Type 1 and Type 2 Antibodies in Rabbit and Human Sera.

Archiv f. d. ges. Virusforschung 35: 349 (1971)

23. Li J.L.H. and Rapp F.

Oncogenic Transformation of Mammalian Cells in Vitro by Proflavine-Photo-inactivated Herpes Simplex Virus Type 2

Cancer Letters I: 319 (1976)

24. Mayr A., Bachmann P.A., Bibrack P., Wittmann G.

Virologische Arbeitsmethoden I

Gustav Fischer Verlag Stuttgart: 263, 366, 594 (1974)

25. Nahmias A., Del Buono I., Pipkin J., Hutton R. and Wickliffe C.

Rapid Identification and Typing of Herpes Simplex Virus Type 1 and 2 by a direct Immunofluorescence Technique.

Appl. Microbiol. 22: 455 (1971)

26. Nahmias A.J., Josey W.E., Naib Z.M., Luce C.F. and Guest B.A.

Antibodies to Herpesvirus Hominis Types 1 and 2 in Humans.
II. Women with Cervical Cancer.

Americ. J. Epidemiol. 91: 547 (1970)

27. Nahmias A.J., Naib Z.M., Josey W.S., Franklin E. and Jenkins R.

Prospective Studies of the Association of Genital Herpes Simplex Infection and Cervical Anaplasia.

Cancer Res. 33: 1491 (1973)

28. Naib Z., Nahmias A. and Josey W.

Cytology and Histopathology of Cervical Herpes Simplex.

Cancer 19: 1026 (1966)

29. Nasemann Th., Schaeg G. und Schultka O.

Viruskrankheiten der Haut, der Schleimhäute und des Genitales

Georg Thieme Verlag Stuttgart: 125 (1974)

30. Nasemann Th., Sauerbrey W.

Lehrbuch der Hautkrankheiten und venerischen Infektionen

Springer Verlag Berlin: 37 (1974)

31. O'Dea J.F. and Dineen J.K.

Fluorescent Antibody Studies with Herpes Simplex Virus in Unfixed Preparations of Trypsinized Tissue Cultures.

J. Gen. Microbiol. 17: 19 (1957)

32. Pacsa A.S., Kummerländer L., Pejtsik B., Krommer K. and Pali K.

Herpes Simplex Virus Specific Antigens in Exfoliated Cervical Cells from Women with and without Cervical Anaplasia.

Cancer Res. 36: 2130 (1976)

33. Petersen E.e., Böcker J.F., Fürmaier I. und Hillemanns H.G.

Herpes-simplex-Virus Typ 2: seine Verbreitung und seine Beziehung zum Zervixcarcinom.

Dtsch. med. Wschr. 50: 1936 (1972)

34. Petersen E.E., Böcker J.F., Schmitt M., Wimhöfer G., Hillemanns H.G.

Zervixcarcinom und Herpes-simplex-Virus Typ 2

In: Sonderforschungsbereich Med. Virol., Uni. Freiburg: 88 (1973 - 75)

35. Pettit Th. H., Kimura S.J., Peters H.

The Fluorescent Antibody Technique in Diagnosis of Herpes Simplex Keratitis.

Arch. Ophthalm. 72: 86 (1964)

36. Majcani J., Ravingerova E., Kocinkova D., Szanto J.

Screening of Antibodies to Herpes Simplex Virus in Human Sera by Indirect Immunofluorescence.

Acta Virol. 17: 61 (1973)

37. Rawls W.E., Laurel D., Melnick J.L., Glickeman J.M. and Kaufman R.M.A.

Search for Viruses in Smegma, Prehalignant and Early Malignant Cervical Tissues. The Isolation of Herpesvirus with Distinct Antigenic Properties.

Amer. J. Epidemiol. 87: 647 (1968)

38. Royston I., Aurelian L. and Davis H.J.

Genital Herpes Virus Findings in Relation to Cervical Neoplasia.

J. Reprod. Med. IV: 109 (1970)

39. Royston I., Aurelian L.

The Association of Genital Herpesvirus with Cervical Atypia and Carcinoma in Situ.

Americ. J. Epidemiol. 91: 531 (1970)

40. Schneeweis K.E.

Die Typen 1 und 2 des Herpes Simplex Virus bei verschiedenen Krankheitsbildern.

Dtsch. med. Wschr. 50: 2313 (1967)

41. Schneeweis K.E., Nahmias A.J.

Antigens of Herpes Simplex Virus Type 1 and 2 - Immundiffusion and Inhibition Passive Hemagglutination Studies.

Z. Immun. Forsch. 141: 471 (1971)

42. Smith W., Lorey S.P., Melnick J.L. and Rawls W.E.

Antibodies to Surface Antigens of Herpesvirus Type 1 and Type 2 - Infected Cells among Women with Cervical Cancer and Control Women.

Infect. and Immunity 3: 305 (1972)

43. Soltz-Szötz J. und Fanda D.

Herpes genitalis

Diagnostik 9: 186 (1976)

44. Thiry L., Sprecher-Goldberger S., Fassin Y., Goeöd I., Gompel C., Pestian J. and de Halleux F.

Variations of Cytotoxic Antibodies to Cells with Herpes Simplex Virus Antigens

to Cells with Herpes Simplex Virus Antigens in Women with Progressing or Regressing Cancerous Lesions of the Cervix.

Americ. J. Epidemiol. 100: 251 (1974)

45. Vestergaard B.F.

Crossed Immunelectrophoretic Characterization of Herpesvirus Hominis Type 1 and 2 Antigens.

Acta path. microbiol. scand. B 81: 808 (1973)

46. Vestergaard B.F., Bog-Hansen T.C.

Detection of Concanavalin A-Binding Herpes Simplex Virus Type 1 and Type 2 Antigens by Crossed Immunoaffinoelectrophoresis.

Scand.J. Immunol. 4,2: 211 (1975)

47. Vestergaard B.F., Grauballe P.C.

Separation and Identification of Herpes Simplex Virus Antigens by Ionexchange Chromatography and Fused Rocket Immunoelectrohporesis.

Scand.J. Immunol. 4,2: 207 (1975)

48. Vestergaard B.F., Thybo H.

Rapid Diagnosis and Typing of Herpesvirus Hominis by the Fluorescent Antibody Method.

Scand. J. Infect. Dis. 6: 113 (1974)

49. Vozza R. and Balducci D.

Technique of Fluorescènt Antibodies in Ophthalmology.

Americ. J. Ophthalm. 52: 72 (1961)

50. Wiesmann E.

Medizinische Mikrobiologie

Georg Thieme Verlag Stuttgart: 320 (1974)

LEBENSLAUF

Name:	Ulrike Kopp, geb. Hultsch
Geburtsdatum:	1. 9. 1951
Geburtsort:	Dresden
Familienstand:	verheiratet seit 10. 5. 1974
Vater:	Günther Hultsch, technischer Kaufmann
Mutter:	Anna-Rosina Hultsch, Maschinenbauingenieur
Geschwister:	zwei Brüder

Umzüge:

1952	von Dresden nach Görlitz/Sachsen
1959	von Görlitz nach München
1977	von München nach Neubiberg

Schule und Studium:

1958-1959	Volksschule in Görlitz
1959-1962	Volksschule in München
1962-1971	Besuch des Willi-Graf-Gymnasiums in München, Abitur
1971-1978	Studium der Medizin an der Ludwig Maximilians-Universität München
Sept. 1972	Vorphysikum
März 1974	Physikum
März 1975	Staatsexamen I. Teil
März 1977	Staatsexamen II. Teil
Mai 1978	Staatsexamen III. Teil
8.6.1978	Approbation

Berufstätigkeit:

ab 1.7.1978	Ärztin beim Blutspendedienst der Landeshauptstadt München